

Uso de Rizobacterias para el Control de Hongos Fitopatógenos y Promoción de Crecimiento en Plantas

Catalina Chávez Betancourt¹, Víctor Olalde Portugal², Abiel Sánchez Arizpe¹, Emilio Padrón Corral³ y Alberto Flores Olivas¹.

¹Departamento de Parasitología Agrícola, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista. 25315. Saltillo, Coah., México. E-mail: catalinitachb@hotmail.com (*Autor responsable). ²Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (Unidad Irapuato). 36500. Apto. Postal 629, Irapuato, Gto., México. ³Centro de Investigación de Matemáticas Aplicadas, Unidad Camporredondo s/n, Edificio "S". 25280. Saltillo, Coah., México.

Abstract

Two bacteria strains were isolated of apple and vanilla rizósfera and was denominated (LPM1) and (LPM2) respectively; they were identified as *Bacillus subtilis* using an on-line biological system and the polymerase chain reaction technique, using the primers G-849 5' GCATATCGGTGTTAGTCCCGTCC 3' and G-850 5' TCGCTAGTAATCGCGGATCAGC 3'. They were determined characteristic as time of generation in two means of cultivations, infusion potato agar (IPA) and infusion potato agar sucrose (IPAS), being observed bigger cellular growth in IPAS and the time of generation of each bacteria was shorter with 0.74 h in IPAS that in IPA, where its time was 1.18 h. Difference was observed in the sensibility to antibiotics on the part of the stumps. In the thin layer chromatography the bands were obtained that faced with *Fusarium* sp. they reached 39.42 inhibition percent. *B. subtilis* produced siderophore like an action mechanism to inhibit mushrooms phytophathogens. The two stumps LPM1 and LPM2 showed enzymatic activity as proteasas, amylasas and casein. The evaluation of antagonism *in vitro* against *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Cephalosporium* sp. and *Dematophora* sp., I reach an average of 26.51 inhibition percent for both stumps, where LPM1 obtained bigger effect with 39.3 percent against *Verticillium* sp. Also, the *B. subtilis*, presented capacity to promote the sorghum development, reaching bigger longitude and weight radicular. LPM1 stimulated but the growth of Sorghum and bean, showing superior values in longitude, weight radicular and fresh weight, although he/she behaved statistically similar to the treatment with LPM2.

Key words: *Bacillus subtilis*, PCR, Rhizosphere

Resumen

Se aislaron dos bacterias de rizósfera de manzana y vainilla, denominadas (LPM1) y (LPM2) respectivamente, se identificaron como *Bacillus subtilis* usando un sistema biológico computarizado y la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, utilizando los oligos G-849 5' GCATATCGGTGTTAGTCCCGTCC 3' y G-850 5' TCGCTAGTAATCGCGGATCAGC 3'. Se determinaron características como tiempo de generación en dos medios de cultivos, infusión papa agar (IPA), e infusión papa agar sacarosa (IPAS), observándose mayor crecimiento celular en IPAS y el tiempo de generación de cada bacteria fue más corto con 0.74 h en IPAS que en IPA, donde su tiempo fue 1.18 h. Se observó diferencia en la sensibilidad a antibióticos por parte de las cepas. En la cromatografía en capa fina se obtuvieron bandas que, enfrentadas con *Fusarium* sp. alcanzaron un 39.42 % de inhibición. *B. subtilis* produjo sideróforos como un mecanismo de acción para inhibir hongos fitopatógenos. Las dos cepas LPM1 y LPM2 mostraron actividad enzimática como proteasas, amilasas y caseína. La evaluación de antagonismo *in vitro* contra *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Cephalosporium* sp. y *Dematophora* sp., alcanzó un promedio de 26.51 % de inhibición por ambas cepas, donde LPM1 obtuvo mayor efecto con 39.3 % contra *Verticillium* sp. Además, los *B. subtilis*, presentaron capacidad para promover el desarrollo de sorgo, alcanzando mayor grosor, longitud y peso radicular. LPM1 estimuló mas el crecimiento de sorgo y frijol, mostrando valores superiores en longitud, peso radicular y peso fresco, aunque se comportó estadísticamente similar al tratamiento con LPM2.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, PCR, rizosfera

Introducción

Las rizobacterias son bacterias benéficas del suelo, que al asociarse con las plantas les permite aumentar su crecimiento y desarrollo; esta estimulación en el crecimiento puede ser debido a la protección que ejercen contra otros organismos del suelo que causan enfermedades, o pueden incrementar el crecimiento por la producción de algún metabolito (Hernández *et al.*, 2003).

Debido a que la rizósfera ofrece la primera línea de defensa contra el ataque de patógenos, se considera que los microorganismos que crecen allí son excelentes para usarse en programas de control biológico, pues el amplio espectro de actividad antagonica de varios microorganismos contra patógenos de las plantas las hace que éstas sean buenos candidatos en el manejo integrado (Podile y Prakash, 1996).

Un gran número de diferentes bacterias de vida libre pueden ser consideradas como cepas de rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR, por sus siglas en inglés), dentro de éstas ha sido reportado que especies del género *Bacillus* y *Pseudomonas* promueven el crecimiento de plantas de diferentes cultivos, tales como trigo, maíz y canela (Abbass y Okon, 1993; Berge *et al.*, 1990; Hong *et al.*, 1991).

Entre los mecanismos de acción de las (PGPR) y de acuerdo a Kloepper *et al.* (1989), las bacterias promotoras de crecimiento pueden tener un impacto favorable sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas por dos vías diferentes: indirectas y directas (Bloemberg y Lugternberg, 2001); entre los mecanismos utilizados en la promoción indirecta se encuentran los relacionados con aspectos de control biológico (Hernández y Charlloux, 2001; Glick *et al.*, 1999a) son, secreción de sideróforos, síntesis de antibióticos, síntesis de cianidina, hidrólisis de ácido fusárico, síntesis de enzimas, tales como quitinasas y β -1,3-glucanasas, competencia por nutrientes; y entre los mecanismos de acción de las PGPR en la promoción directa del crecimiento de plantas están: Fijación de nitrógeno (Strenhoudt y Vanderleyden, 2000), incremento en la disponibilidad de minerales, síntesis del ácido indolacético, giberelinas y citocininas (Bari y Okin, 1993; Cassan *et al.*, 2001; García *et al.*, 2001), y regulación de niveles de etileno por acción de la enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (Shah *et al.*, 1998; Belimov *et al.*, 2002).

Es por todo esto que este trabajo tuvo como objetivo aislar, identificar, caracterizar y evaluar el efecto antagonico y promotor de crecimiento, de dos bacterias aisladas de rizósfera de vainilla y manzano contra cuatro hongos asociados a la pudrición radical del manzano.

Materiales y Métodos

Material biológico

Rizobacterias. Como cepas de referencia, se utilizaron las bacterias *Bacillus subtilis* Beb 8.0, *B. subtilis* Beb 13.0 y *Pseudomonas putida*, las cuales fueron proporcionadas por el laboratorio de Bioquímica Ecológica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) Unidad Irapuato-Guanajuato. Se estudiaron dos bacterias antagonicas aisladas de la rizósfera de manzano (LPM 1) y vainilla (LPM 2) en Coahuila y Veracruz, México respectivamente.

Hongos Fitopatógenos. Se realizaron aislamientos de algunos patógenos de raíces dañadas de árboles de manzano en el estado de Coahuila, México. Para lo cual, se tomaron fragmentos de raíces, y se lavaron y desinfectaron con hipoclorito de sodio. Cada fragmento de 1 cm se sembró en medio papa dextrosa agar (PDA). Cada aislado se identificó hasta género.

Con estos aislados se realizaron las pruebas de patogenicidad, para ello, se preparó un concentrado de esporas, colocando un explante de cada hongo de 5 mm de diámetro en un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril; los tubos se agitaron durante 1 min en un agitador eléctrico (Vortex-Genie). Enseguida, con una micropipeta se tomó una alícuota de 1 mL de la suspensión conidial y se depositó en el hematocitómetro para realizar el conteo de esporas y ajustar a una concentración de 1×10^5 conidias/mL.

De esta suspensión se tomó 1 mL y se aplicó directamente a la raíz de árboles jóvenes de manzano de 1.20 m de altura; y se esperó a que se presentaran los primeros síntomas, para reaislar los hongos y corroborar los postulados de Koch.

Estudios de antagonismo *in vitro*. Se utilizaron los aislamientos de *Bacillus subtilis* Beb 8.0, *B. subtilis* Beb 13.0, *P. putida*, la cepa de vainilla (LPM 2) y cepa de manzano (LPM 1). En el centro de las placas con PDA, se sembró un explante de 5 mm de diámetro de cada uno de los hongos aislados; alrededor del explante, a una distancia de 30 mm, se sembraron por picadura cuatro puntos con cada una de las bacterias antagonicas. Las bacterias se incubaron a 25 °C durante siete días y al término de este tiempo se midió el diámetro del halo de inhibición.

Los datos se analizaron bajo un diseño completamente al azar y se realizó, además, una prueba de comparación de medias Tukey al 1% de significancia, con el programa estadístico de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Caracterización de rizobacterias

Para la caracterización de estas cepas, se realizaron diferentes pruebas para su identificación.

Antibiograma. Las bacterias se sembraron en matraces de 250 mL, con 50 mL de caldo de infusión de papa agar (IPA), se incubaron en agitación a 30 °C durante 24 h. Después de la incubación se tomaron 0.5 mL del inóculo y se colocaron en una caja petri con IPA, el inóculo se distribuyó homogéneamente en toda la caja. Después se colocaron equidistantes sensidiscos de los siguientes antibióticos marca Bio-RAD. SA: Amikacina 30 mcg, Ampicilina 10 mcg, Cefalotina 30 mcg, Ceftriaxona 30 mcg, Cloranfenicol 30 mcg, Dicloxacilina 1 mcg, Enoxacina 10 mcg, Eritromicina 15 mcg, Gentamicina 10 mcg, Netilmicina 10 mcg, Penicilina 10 U y Timetoprin-Sulfametaxazol 25 mcg, dichas cajas se incubaron a una temperatura de 28 – 30 °C durante 24 h. Después de la incubación se midió el halo de inhibición del crecimiento bacteriano.

Determinación del crecimiento bacteriano. Las dos rizobacterias aisladas, de manzana (LPM1) y vainilla (LPM2), se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 50 mL de medio infusión de papa, incubándolas en agitación a una temperatura de 30 °C durante 24 h; posteriormente en matraces de 125 mL, conteniendo 30 mL de medio IPA y medio IPAS, fueron inoculados con 1 mL de suspensiones celulares ajustadas a una densidad poblacional de 2.1×10^7 UFC/mL para *B. subtilis* LPM1 y de 1.8×10^7 UFC/mL para *B. subtilis* LPM2.

El crecimiento celular se determinó por turbidimetría a 535 nm, realizando las lecturas cada 2 h (tiempo 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12) durante 12 h. Para cada una de las bacterias se estableció una relación densidad óptica (absorbancia a 535 nm), contra densidad poblacional (UFC/mL). La correlación densidad óptica se realizó colocando 1 mL del cultivo bacteriano en las celdas del espectrofotómetro para así medir su turbidez a 535 nm, esta medición se realizó para cada uno de los tiempos y bacterias. La determinación del número de UFC/mL se hizo utilizando el equipo Automated Spiral Plater, el cual siembra las bacterias en los medios IPA e IPAS en forma de espiral, se realizaron diluciones seriadas de cada uno de los tiempos y bacterias para posteriormente incubarlas a 30 °C durante 24 h para así realizar el conteo de colonias por mL. Se determinó el tiempo de generación.

Presencia de sideróforos. Se realizó sembrando las bacterias por picadura en cajas petri conteniendo medio de B de King, después se incubaron a 28 – 30 °C durante 24 h. Después de la incubación se agregó 1 mL del reactivo de Chrome azurol S 4 mM (CAS), dejando las cajas en

reposo durante 1 min, al término de este tiempo se observó el cambio de color azul a anaranjado, lo que indicó la presencia de sideróforos.

Caracterización del compuesto antagónico. De los cultivos bacterianos utilizados para determinar el crecimiento de las bacterias, una vez transcurrido el tiempo para alcanzar la fase estacionaria, se tomaron 30 mL de la suspensión y los sobrenadantes de estos cosechados por centrifugación se filtraron y al sobrenadante estéril se le adicionó etanol al 80 % (v/v) para concentrar la muestra hasta un volumen final de 5 mL por medio de un Rotovapor RE 111 (Buchii 461) a 60 °C. Este extracto concentrado del tiempo 12 h de cada una de las bacterias en los 2 medios se utilizó para realizarles cromatografía en capa fina en donde se aplicó en placas de 20 x 20 cm, cubiertas con una capa de sílice (Silica Gel 606, Merk) de 0.5 mm de espesor. Las placas fueron desarrolladas con etanol: agua (2:1 v/v) y mezcla de cloroformo: metanol: agua (65:25:4 v/v). Las bandas fueron visualizadas con luz UV y reveladas con ninhidrina al 2 %. Posteriormente se rasparon las bandas obtenidas y se diluyeron en etanol al 80 %, se mezclaron y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 2 min recuperando el sobrenadante y eliminando la pastilla, este procedimiento se repitió tres veces para eliminar así los restos de la sílica gel, teniendo ya el sobrenadante, se concentraron las bandas en el rotavapor hasta obtener un volumen de aproximadamente 1,5 mL; este sobrenadante concentrado se utilizó para determinar la actividad antagónica utilizando la técnica de placa envenenada contra *Fusarium* sp.

Actividad enzimática. Para determinar la actividad enzimática de las bacterias se prepararon los siguientes medios: amilasas; el medio se preparó en dos partes A) 1 % de almidón se disolvió en 50 mL de regulador de fosfatos pH 6.8 50 mM en baño maría, B) 5 % de agarosa se disolvió en 50 mL de regulador de fosfatos pH 6.8 50 mM. Ya disueltas estas partes, se mezclaron y se vaciaron en las cajas petri, se dejó solidificar y se colocaron 10 µL del cultivo puro de 8 h de cada una de las bacterias, se incubaron por 2 h a 37 °C. Después de la incubación se colocaron las cajas en presencia de vapores de yodo. Proteasas: esta prueba también se prepara en dos partes; A) 1 % de gelatina disuelta en 50 mL de regulador de fosfatos pH 6.8 50 mM en baño de maría. B) 0.5 % de agarosa disuelta en 50 mL de regulador de fosfatos pH 6.8 50 mM, disueltas estas dos partes se mezclan y se vacían en cajas petri en capa delgada. Ya solidificadas, se colocaron 10 µL del cultivo puro de 0 h de cada una de las bacterias. Se incubaron 2 h a 37 °C, al término de este tiempo se le adicionó el colorante de Coomassie y se procedió a leer la prueba. Caseína: se preparó en dos partes, A) 0.25 % de caseína se disolvió en 50 mL de tris 50 mM pH 8.0, en baño maría, B) 0.5 % de agarosa se disolvieron

en tris 50 mM pH 8.0. Ya disueltas las partes se mezclaron y se vaciaron en las cajas petri, después de solidificar se colocaron 10 µL de las cepas bacterianas, se incubaron por 2 h a 37 °C y finalmente se les adicionó colorante de azul de Coomasie para leer la prueba.

Identificación de cepas bacterianas antagónicas. La identificación de las bacterias antagonistas aisladas de la rizósfera de vainilla (LPM 2) y raíz de manzano (LPM 1) se realizó mediante las pruebas bioquímicas para bacterias Gram positivas (+) que indica el sistema biológico computarizado Microlog System, Release 4.2, se sembraron las bacterias en medio BUG (medio de crecimiento universal Biolog) por estría y se incubaron a 30 °C durante 24 h, posteriormente se tomó una asada de la bacteria y se mezcló con el fluido de inoculación hasta obtener una turbidez estándar de 28 % T igual al control, las placas se inocularon con 150 µL de cada bacteria en cada uno de los pozos, los cuales son 95 fuentes de carbono diferentes, se incubaron a 30 °C durante 16 – 24 h, haciendo las lecturas de cada uno de estos tiempos. La identificación a nivel molecular se realizó mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), sembrando las bacterias en cajas petri con medio LB por estría cruzada, incubándolas a 37 °C por no más de 18 h, al cabo de este tiempo se resuspendieron las colonias en 50 µL de agua ampollita, de este cultivo se inoculó un matraz de 125 mL con 10 mL de medio LB el cual se incubó a 37 °C en agitación por no más de 18 h; se tomaron alícuotas de 50 µL y se centrifugaron por 1 min a 12.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se adicionó 10 µL de agua de ampollita; estas alícuotas se congelaron a – 70 °C con hielo seco-etanol por 30 s e inmediatamente se pasaron a 65 °C por 30 s para descongelar, este procedimiento se repitió tres veces, se tomó una alícuota de 1 µL para la reacción de PCR para obtener un volumen total de 25 µL. 22 µL de Platinum Super Mix, 1 µL de aproximadamente 100 ng del oligo G-849 5' GCATATCGGTGTTAGTCCCGTCC 3' y 1 µL del oligo 2. G-850 5' TCGCTAGTAATCGCGGATCAGC 3' elaborados por la compañía Genosys, más 1 µL de la muestra. El programa utilizado en el termociclador fue: 1.94 °C por 8 min, 2.94 °C por 30 s, 3.50 °C por 30 s, 4. 72 °C 1 min, 5. ciclo 2 al 5, 8 veces., 6.94 °C, 30 s, 7.58 °C, 30 s, 8.72 °C 1min 45 s o 2 min, 9. ciclo 6 al 9, 22 veces, 10.72 °C por 8 min, 11.4 °C. Al término de la reacción se procedió a correr el producto del PCR en gel de agarosa al 2 %, se utilizó un control positivo *B. subtilis* PY.

Efecto de rizobacterias sobre el crecimiento vegetativo de frijol y sorgo. Se realizó en cámara bioclimática, en donde se desinfectaron las semillas de frijol y sorgo, las cuales se sembraron en macetas de 1 l, en suelo previamente esterilizado a 120 °C durante 15 min;

se evaluaron las 2 cepas (LPM1 y LPM2) y 1 testigo al cual sólo se le aplicó agua; las semillas se inocularon con 1 mL de la suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^8 UFC mL⁻¹ y se incubaron a 26 °C, con periodos de luz constante. Las plantas de frijol se dejaron por 25 días y las de sorgo por 35 días. Al término de ese tiempo se evaluaron las siguientes variables: peso fresco de planta y raíz, peso seco de planta y raíz, altura de planta y longitud de raíz. Los datos se analizaron mediante el programa estadístico de la Universidad de Nuevo León utilizando un diseño completamente al azar y la prueba de comparación de medias de Tukey al 5 % de significancia.

Determinación de la actividad de la enzima ACC deaminasa. Las cepas bacterianas se dejaron crecer en medio líquido de infusión papa en condiciones de agitación a 120 rpm a 30 °C durante 18 h, posteriormente, una alícuota de este cultivo se sembró por estría abierta en medio sólido mínimo de sales DF (Dworkin y Foster, 1958), suplementado con 2 g de (NH₄)₂SO₄ o ACC 3mM como única fuente de nitrógeno. Se incubaron de 28 a 30 °C durante 5 días, después se evaluó la presencia de crecimiento.

Resultados y Discusión

Se aislaron cuatro hongos de tejido enfermo y se identificaron como *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Cephalosporium* sp. y *Dematophora* sp., de acuerdo con las claves de identificación de Barnett y Hunter (1998), además los resultados de los postulados de Koch corroboraron que estos hongos son patógenos ya que en forma individual, cada uno de ellos causó lesiones y síntomas característicos de la pudrición de raíz del manzano.

Una alternativa al control de la enfermedad es la utilización de bacterias antagónicas para lo cual, se aislaron dos bacterias con potencial la LPM1 y LPM2. Como se mencionó en materiales y métodos, se comparó su efecto antagónico contra los agentes etiológicos antes mencionados y contrastando su efecto con algunas cepas reconocidas como buenas antagónicas *B. subtilis* Beb (8 y 13), *Pseudomonas putida*. Estas tres cepas de colección inhibieron 29.0, 28.3 y 9.54 % respectivamente, frente a los 4 hongos.

Por otra parte, las cepas LPM1 y LPM2, se comportaron estadísticamente iguales a los *B. subtilis* de referencia, obteniendo un 20.0 % y 25.6 % de inhibición micelial. La cepa LPM1 tuvo un efecto del 40 % de inhibición del crecimiento de *Verticillium* sp. Todos estos resultados concuerdan con lo reportado por Alcaraz *et al.* (1999), donde menciona a *Bacillus* spp. *in vitro* como un biocontrolador en potencia de hongos fitopatógenos como

Fusarium sp. Una actividad similar contra el alga *Phytophthora capsici* ha sido previamente reportada por Lagunas *et al.* (2001) con otras cepas de *Bacillus* sp, estos autores consignan que lograron inhibir el crecimiento micelial del patógeno en un 41 %.

A través del antibiograma como se muestra en la Cuadro 1, se confirma que fueron cepas diferentes. Adicional a esto, lo datos muestran la sensibilidad a gentamicina, antibiótico que se utiliza para el control de bacterias.

Cuadro 1. Sensibilidad y resistencia a antibióticos de *B. subtilis* LPM1 y LPM2

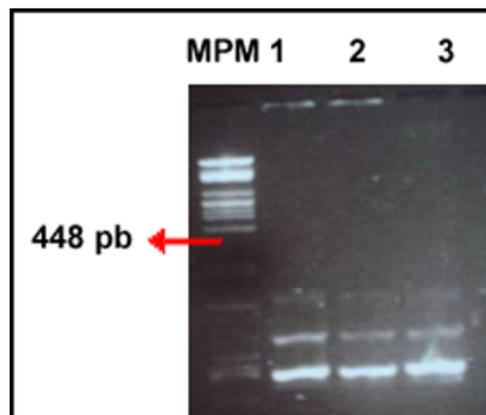
Antibióticos	Cepa LPM 1	Cepa LPM 2
Amikacina 30 mcg (AK)	+	+
Ampicilina 10 mcg (AM)	+	-
Cefalotina 30 mcg(CF)	+	+
Ceftriaxona 30 mcg (CRO)	+	+
Cloranfenicol 30 mcg (CL)	+	+
Dicloxacilina 1 mcg (DC)	-	-
Enoxacina 10 mcg (ENX)	+	+
Eritromicina 15 mcg (E)	+	+
Gentamicina 10 mcg (GE)	+	+
Netilmicina 30 mcg (NET)	+	+
Penicilina 10 U (PE)	-	-
Timetoprin-Sulfametaxasol 25 mcg (SXT)	+	+

(+) Sensible (Forma Halo) (-) Resistente (No forma halo o muy pequeño)

Las dos cepas se identificaron utilizando el Biolog System, dando 100 % de probabilidad de ser *B. subtilis* con una similitud de 0.67. Esto se confirmó con la amplificación de una secuencia específica, como se observa en la Figura 1. Donde una banda de 448 bp es igual que la cepa de *B. subtilis* utilizada de referencia.

Las dos cepas de *B. subtilis* se caracterizaron en cuanto al tiempo de generación en dos medios de cultivo. Se observó que los dos cultivos IPA y IPAS permiten el crecimiento de las dos cepas de *B. subtilis* (Cuadro 2). Sin embargo, el crecimiento es mejor en el medio que se le adicionó sacarosa, permitiendo un mayor número de células y reduciendo el tiempo de generación. Características que son importantes para el proceso de producción. Asimismo, al ser capaces de crecer y mantener tasas de crecimiento relativamente rápidas sin requerimientos nutricionales complejos, lo que permitirá un medio barato para la producción masiva. Esas

características junto con la capacidad de sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas, son criterios considerados para obtener un antagonista ideal (Baker,



1987).

Figura 1. Amplificación de secuencias específicas de *B. subtilis* mediante la técnica de PCR. 1. Muestra de bacteria aislada de Vainilla 2. Muestra de bacteria aislada de Manzano 3. Control Positivo *Bacillus subtilis* PY.

Cuadro 2. Determinación del tiempo de generación de dos cepas de bacterias de rizósfera de manzana y vainilla, denominadas (LPM1) y (LPM2) respectivamente, identificadas como *Bacillus subtilis* en medios: infusión papa agar (IPA) e infusión papa agar sacarosa (IPAS).

Cepa	N (UFC mL ⁻¹)	TG (h)
LPM 1 (IPA)	3 x 10 ⁷	1.14
LPM 1 (IPAS)	1.5 x 10 ⁹	0.61
LPM 2 (IPA)	1.4 x 10 ⁷	1.23
LPM 2 (IPAS)	1.6 x 10 ⁹	0.87

N: Número final de células; TG: Tiempo de generación;

En cuanto a los mecanismos que se han reportado para describir el efecto inhibitorio hacia los hongos fitopatógenos por parte del género *Pseudomonas* y *Bacillus* están la producción de antibióticos, sideróforos, enzimas líticas y HCN, entre otros (Schroth y Hancock, 1981; Tapia *et al.*, 1990; Fravel, 1988).

En este sentido, las dos cepas de *B. subtilis* LPM1 y LPM2 producen sideróforos, lo cual puede ser considerado como parte de su mecanismo de inhibición hacia *Fusarium* sp, *Verticillium* sp, *Cephalosporium* sp y *Dematophora* sp debido a que los sideróforos son compuestos quelantes que atrapan el hierro del medio donde se encuentren, dejando una deficiencia de hierro para los patógenos; estos

resultados son similares a lo reportados (Schroth y Hancock, 1981) y (Tapia *et al.*, 1990).

Con la finalidad de hacer una identificación parcial del compuesto(s) responsable(s) de la actividad antagonica, se realizó la cromatografía en capa fina (TLC). A través de la cromatografía se lograron separar 4 bandas para *B. subtilis* LPM 2, y una banda en el extracto de la cepa LPM1. Estas bandas se eluyeron como se indica en materiales y métodos, y se enfrentaron a *Fusarium* sp. El Cuadro 3 muestra los valores Rf de cada una de las bandas, y también muestra el % de inhibición de cada una de las bandas. Se observó que la banda con un Rf de 0.895 que resultó positiva para ninhidrina y fue la que mostró una mayor actividad antagonica frente a *Fusarium* sp., lo que posiblemente indica que uno de los compuestos responsables de la actividad antifúngica se encuentra en compuestos que contienen grupo amino. Resultados anteriores, han mostrado que parte de la actividad antagonica es debida a polipéptidos, como la iturina A y micosubtilina (Besson *et al.*, 1987). Por otra parte, estos resultados también sugieren que existen otros componentes antagonicos cuya naturaleza no es peptídica.

Cuadro 3. Valores de Rf y porcentaje de inhibición vs *Fusarium* sp. de las bandas obtenidas por cromatografía del extracto concentrado de bacterias antagonistas.

Banda	Rf	Inhibición (%)
1 LPM2	0.980	28.3
2 LPM2	0.734	32.6
3 LPM2	0.698	35.7
4 LPM2	0.496	25.2
1 LPM1	0.895	39.4

Como se mencionó, la presencia de enzimas líticas es otro posible mecanismo de actividad antagonica. La actividad enzimática para la cepa LPM 2 solo resultó positiva para algunas proteasas que degradan caseína, mientras la cepa LPM1 sintetiza amilasas y proteasas. Estos resultados confirman la gran variedad de enzimas que producen los *B. subtilis* como amilasas, proteasas, lipasas y oxidasas (Ferreira *et al.*, 1991). Así mismo, se ha demostrado la capacidad de degradar y descomponer las sustancias tóxicas que han sido aplicadas al suelo.

Adicional a un mecanismo antagonico de las PGPRs también se ha demostrado su capacidad de estimular el desarrollo de la planta. En este sentido, las dos cepas incrementaron significativamente el desarrollo de las plantas. La cepa LPM 1 incremento del 30 % con respecto al testigo.

Por otra parte, el tratamiento con *B. subtilis* LPM 2

también obtuvo una diferencia estadísticamente significativa en longitud con respecto al testigo con un 21.2 % mas de longitud frente a éste, como lo muestra la Figura 2. En cuanto al peso fresco de la planta las cepas LPM 1 y LPM 2 mostraron un mayor peso frente al testigo, 411 % y 135 % mas de peso fresco con respecto al testigo; resultados

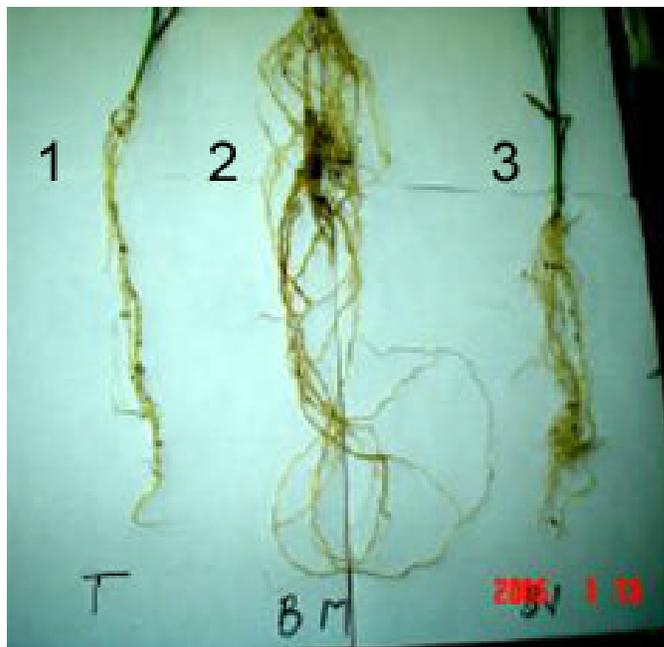


Figura 2. Longitud de raíz de sorgo tratadas con dos cepas de bacterias de rizósfera de manzana y vainilla, denominadas (LPM1) y (LPM2) respectivamente, identificadas como *Bacillus subtilis*. Tratamientos: 1. Testigo; 2. *B. subtilis* LPM 1; 3. *B. subtilis* LPM 2.

similares obtuvo Lagunas *et al.* (2001), en donde observaron un incremento en el volumen radical y peso de follaje de plantas de chile con aplicaciones semanales de *B. subtilis*.

En el caso de longitud de raíz, se obtuvo la misma promoción de crecimiento, observándose una tendencia de mayor longitud y peso por parte de las plantas que fueron tratadas con *B. subtilis* LPM 1 y LPM 2 respecto al testigo, obteniendo un 511.5 % y 126.4 %. Dashti *et al.* (1997) observaron un mayor crecimiento en el sistema radicular de plántulas de lechuga al realizar aplicaciones con *Bacillus*. Estos resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Pereira *et al.* (1988) y Kloepper *et al.* (1991), quienes mencionaron que las bacterias promotoras de crecimiento como *P. fluorescens* y *B. subtilis*, se caracterizan por incrementar el desarrollo radical, lo que repercute directamente en el rendimiento del cultivo, debido a que posiblemente existió un sinergismo entre el hospedante y los simbiontes, lo que permitió la mejor absorción de elementos esenciales como el N y el P. Este incremento de desarrollo de la raíz se ha adjudicado al papel de la sustancias reguladoras de crecimiento como las auxinas y

la acción de la enzima ACC oxidasa, enzima que permite a la bacteria utilizar el ACC (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico) como fuente de nitrógeno, y que al disminuir el ACC en la raíz, no se produce suficiente etileno para detener el crecimiento de ésta (Glick., 1995). Las dos cepas de *B. subtilis* LPM1 y LPM2, fueron capaces de sintetizar la enzima ACC desaminasa, la cual hidrolizó el ACC (Penrose y Glick, 2003).

Finalmente, el presente trabajo demostró que dos cepas nativas de *B. subtilis*, presentan los dos mecanismos de promoción del crecimiento de la planta, y que tienen el potencial de controlar a diferentes patógenos de raíz de manzano.

Conclusiones

Las cepas de *B. subtilis* (LPM1) y (LPM2) tuvieron la capacidad de inhibir el crecimiento micelial de *Fusarium* sp., *Verticillium* sp., *Cephalosporium* sp. y *Dematophora* sp., *in vitro*. *B. subtilis* fue capaz de crecer y aumentar el número de células, reduciendo el tiempo de generación, sin requerimientos nutricionales complejos. Los metabolitos responsables de la actividad de inhibición de las cepas de *B. subtilis* LPM1 y LPM2, son del grupo amino y otros cuya naturaleza no es peptídica, además de la producción de enzimas líticas como proteasas y amilasas. Las cepas de *B. subtilis* son promotoras de crecimiento de plantas, debido posiblemente a que fueron capaces de sintetizar la enzima ACC desaminasa. Uno de los mecanismos de acción de *B. subtilis* para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos es la presencia de sideróforos.

Literatura Citada

Abbass, Z. and Y. OKon. 1993. Plant growth promotion by *Azotobacter paspali* in the rhizosphere. *Soil Biochem.* 25:1075-1083.

Alcaraz, F and B. Visitin Gy Garcia. 1999. Selección *in vitro* de *Bacillus* spp como biocontroladores de *Fusarium*. *Rev. Argent. Fitopatol.* 34(2).

Baker, R., Y. Elad and Y. Chet. 1984. The controlled experiment in the scientific method with special emphasis on biological control. *Phytopathol.* 74:1019-1021.

Baker; K. F. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25:67-85.

Bari, T and Y. Okin. 1993. Tryptophan conversion to indole-3-acetic acid via indole-3-acetamida in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Can. J. Microbiol.* 39:81-86.

Barnett, H and B. Hunter. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 3rd ed. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA. 218 p.

Belimov, A. A., V. I. Safronova and T. Mimur. 2002. Response of spring rape (*Brassica napus* var. *olifera*

L.) to inoculation with plant growth promoting rhizobacteria containing 1 aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase depends on nutrient status of the plant. *Can. J. Microbiol.* 48:189-199.

Berge, O., J. Fages, D. Mulard and J. Balandreau. 1990. Effects of inoculation with *Bacillus circulans* and *Azospirillum lipoferum* on crop-yield in field growth maize. *Symbiosis* 9:259-266.

Besoon, F., C. Chevanet and G. Michel. 1987. Influence of the culture medium on the production of iturin A by *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 133:767-772.

Bloemberg, G. V and B. J. J. Lugtenberg. 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* 4:343-350.

Cassan, F., R. Bottini, G. Schneider and P. Piccoli. 2001. *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum* hydrolyz conjugates of GA₂₀ and metabolise that resultant aglycones to GA₁ in seedlings of rice dwarf mutants. *Plant Physiol.* 125:2053-2058.

Dashti, N., F. Zhang, R. Hynes and D. L. Smith. 1997. *Plant and Soil.* 188, 33.

Ferreira, J., F. N. Malthée and A. C. Thomas. 1991. Biological control of *Eutypa lata* on grapevine by a antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. *Phytopathol.* 81:283-287.

Fravel, D. R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Ann. Rev. Phytopathol.* 26:75-91.

Garcia de Salamone, I. E., R. K. Inés and L. M. Nelson. 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can J. Microbiol.* 47:404-411.

Glick, B. R. 1995. The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41:109-117.

Glick, B. R., C. L. Patten, O. Holguin and D. M. Penrose. 1999a. Biocontrol Mechanism. Chapter 7. pp. 86-133. *In: Biochemical and genetic mechanism used by plant growth promoting bacteria.* Imperial Collage Press. Ontario, Canada.

Hernández, D. M y M. L. Charlloux. 2001. La nutrición mineral y la biofertilización en el cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) *Temas Cien. Tecnol.* 5:11-27.

Hernández, M. y A. Escalona. 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana.* Veracruz. México. 16 (1).

Hong, Y., B. R. Glick and J. J. Pasternak. 1991. Plant-microbial interaction under gnotobiotic conditions: A scanning electron microscope study. *Current Microbiol.* 23:111-114.

- Kloepper, J.W. 1991. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents of soilborne diseases. pp. 142-52. In: J. Bay-Peterson (Ed.) The biological control of plant diseases. Food and Fertilizer Technological Center Taiwán.
- Kloepper, J.W., R. Lifshitz and R. Zablotowicz. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends Biotechnol. 7:39-49.
- Lagunas, L. J., Z. E. Mejia, O. S. Kawasoe y A. S. Ocampo. 2001. *Bacillus firmus* como agente de control biológico de *Phytophthora capsici* Leo. En jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Rev. Mex. Fitopatol. 19 (1): 57-65.
- Penrose, D. M and B. R. Glick. 2003. Methods for isolation and characterization ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. Physiol. Plant. 118:10-15.
- Pereira, J., A. R. Cavalcante, V. A. Baldani and J. Dobereiner. 1988. Sorghum and rice inoculation with *Azospirillum* sp. Y *Herbaspirillum seropedicae* in field. Plant Soil. 110:269-274.
- Podile, A. R and A. P. Prakash. 1996. Lysis and biological control of *Aspergillus Niger* by *Bacillus subtilis* AF-1. Can J. Microbiol. 42:533-538.
- Schoroth, M. N and J. G. Hancock. 1981. Selected topics in biological control. Annu. Rev. Phytopathol. 35:453-476.
- Shah, S., J. Li, B. A. Moffatt and B. R. Glick. 1998. Isolation and characterization of ACC deaminase genes from two different plant growth promoting growth rhizobacteria. Can. J. Microbiol. 44:833-843.
- Strenhoudt, O and J. Vanderleyden. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses; biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol. Rev. 24:487-506.
- Tapia-Hernández, A., M. A. Mascarua-Esparza and J. Caballero-Mellado. 1990. Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. Microbios. 64:73-83.
-